1. OBJETIVO

Detectar la presencia de *Listeria monocytogenes*, en muestras de alimentos mediante sistema molecular automatizado que utiliza la reacción de polimerasa en cadena (PCR). Utilizar como método de screening luego de la etapa de enriquecimiento.

2. CAMPO DE APLICACIÓN Y ALCANCE

Aplicar este procedimiento en muestras de productos lácteos, frutas y vegetales (excepto rábanos), mariscos y carne (cruda y procesada) y pollo.

3. FUNDAMENTO

El sistema de detección BAX es un método automatizado para detección de microorganismos en muestras ambientales y de alimentos. Fue el primer método de screening basado en PCR, combina la tecnología de PCR con la detección por fluorescencia.

El ADN de la muestra se combina con ADN polimerasa, nucleótidos y partidores específicos. Esta mezcla es sometida a una serie de ciclos de calentamiento y enfriamiento. Al calentar se desnatura el ADN por consiguiente la doble hebra de ADN se abre, luego al enfriar, los partidores que son fragmento de ADN específicos para *Listeria monocytogenes,* reconocen la zona de enlace, luego la enzima usa los nucleótidos extendiendo la nuevas hebras de ADN y así sucesivamente hasta lograr en corto tiempo, crear millones de copia del ADN buscado, si es que este se encuentra presente en la muestra.

Cada vez que se produce la amplificación, el colorante fluorogénico incluido en la tableta de PCR se intercala en la doble hebra de ADN y emite una señal fluorescente. Luego en la fase de detección esta señal es medida. Durante la detección la temperatura es llevada al punto en donde las hebras de ADN se separan, liberando el colorante y bajando la señal. Este cambio en la fluorescencia es trazado contra la temperatura generando la curva de meeting, la cual es interpretada por el software del sistema BAX.

4. REFERENCIAS

4.1 AOAC Microbiological Methods. Chapter 17 p 235

4.2 Manual de usuario DuPont Qualicon BAX System

5. TERMINOLOGÍA

5.1 PCR= Reacción de la Polimerasa en Cadena.

5.2 MOPS= [3-(N-morpholine) propanesulfonic acid]

5.3 MOPS-BLEB= [3-(N-morpholine) propanesulfonic acid]-Buffered Listeria Enrichment Broth.

6. MATERIALES, INSUMOS Y EQUIPOS

6.1 Materiales e Insumos

6.1.1 Cronómetro.

6.1.2 Gradilla de enfriamiento a 4ºC.

6.1.3 Guante de látex libres de polvo

6.1.4 Herramienta de trabajo para tubos de lisis (color azul)

6.1.5 Herramienta de trabajo para tubos de reacción (color gris)

6.1.6 Micropipeta calibrada de 1 a 10 µL calibrada

6.1.7 Micropipeta calibrada de 8 canales de 5 a 50 µL calibrada.

6.1.8 Micropipeta calibrada de 20 a 200 µL calibrada

6.1.9 Plumón permanente punta fina para marcar tubos

6.1.10 Puntas largas para micropipeta de 10 y 200 µL

6.1.11 Punta tipo jeringa para repetidor

6.1.12 Repetidor de volumen

6.1.13 Tapas ópticas para tubos de PCR

6.1.14 Tijera de uso exclusivo para la técnica.

6.1.15 Tubos de lisis con tapas y rack

6.1.16 Tubos de PCR con tableta reactiva

6.2 Medios de cultivo y reactivos

6.2.1 Ácido nalidíxico al 0,5% p/v

6.2.2 Acriflavina al 0,5% p/v

6.2.3 Buffer de lisis

6.2.4 Caldo de Enriquecimiento Selectivo Completo *Listeria* AOAC 17.10.10 C (f).

6.2.5 Caldo UVM AOAC 17.10.10 C (g).

6.2.6 Caldo Demi-Fraser AOAC 17.10.10 C (h).

6.2.7 Caldo de enriquecimiento *Listeria* AOAC 17.10.10 C (e)

6.2.8 Caldo de preenriquecimiento universal. AOAC 17.10.10 C (j)

6.2.9 Caldo MOPS-BLEB, en tubos con 9,9 mL AOAC 17.10.10 C (i)

6.2.10 Caldo MOPS-BLEB, en tubos con 9,0 mL AOAC 17.10.10 C (i)

6.2.11 Ciclohexamida al 1% en solución al 40% p/v etanol/agua destilada

6.2.12 Etanol al 70%

6.2.13 Proteasa

6.2.14 Solución de hipoclorito de sodio de uso doméstico al 1% en agua destilada

6.3 **Equipos**

6.3.1 Balanza de precisión con sensibilidad 0,1 g.

6.3.2 Computador en línea con el termociclador y de uso exclusivo

6.3.3 Impresora en línea con el termociclador y de uso exclusivo

6.3.4 Incubadora a 30 ± 1ºC

6.3.5 Incubadora a 35 ºC ± 1ºC

6.3.6 Placa calefactora regulada a 55 ± 1ºC, con su respectivo termómetro

6.3.7 Placa calefactora regulada a 95 ºC +/-1ºC, con su respectivo termómetro.

6.3.8 Regulador de voltaje

6.3.9 Stomacher 400.

6.3.10 Termociclador Applied Biosystem BAX System Q7.

6.3.11 Vortex

7. DESARROLLO

7.1 ENRIQUECIMIENTO PRIMARIO

7.1.1 **Enriquecimiento para productos lácteos**

7.1.1.1 Pesar 25 g de la porción en bolsa Stomacher

7.1.1.2 Homogenizar en Stomacher por 30 segundos con 225 mL de caldo de enriquecimiento completo.

7.1.1.3 Incubar 22-24 h a 30ºC ± 1ºC.

7.1.1.4 Preparar caldo de enriquecimiento completo según ANEXO 1, letra c).

7.1.2 **Enriquecimiento para carnes de vacuno y pollo procesadas**

7.1.2.1 Pesar 25 g de la porción en bolsa Stomacher.

7.1.2.2 Homogenizar en Stomacher por 30 segundos con 225 mL de caldo UVM.

7.1.2.3 Incubar 22-24 h a 30ºC ± 1º C.

7.1.2.4 Preparar caldo UVM según ANEXO 1, letra d).

7.1.3 **Enriquecimiento para carnes de vacuno y pollo crudas**

7.1.3.1 Pesar 25 g de la porción en bolsa Stomacher.

7.1.3.2 Homogenizar en Stomacher por 30 segundos con 225 mL de caldo Demi-Fraser.

7.1.3.3 Incubar 22-24 h a 30ºC. ± 1ºC.

7.1.3.4 Preparar caldo Demi Fraser según ANEXO 1, letra a).

7.1.4 **Enriquecimiento para frutas vegetales y mariscos, excepto pescado ahumado**

7.1.4.1 Pesar 25 g de la porción en bolsa Stomacher.

7.1.4.2 Homogenizar en Stomacher por 30 segundos con 225 mL de caldo de enriquecimiento.

7.1.4.3 Incubar 4 h a 30ºC ± 1ºC y luego agregar 0,45 mL de acriflavina al 0,5% p/v, 1,8 mL de ácido nalidíxico al 0,5% p/v, y 1,15 mL de ciclohexamida al 1% p/v.

7.1.4.4 Continuar con la incubación por 20 horas a 30 ºC. ± 1ºC

7.1.4.5 Preparar caldo de enriquecimiento según ANEXO 1, letra b).

7.2 **ENRIQUECIMIENTO SECUNDARIO**

7.2.1 Después de 22 a 24 horas de incubación, transferir 0,1 mL del enriquecido a tubos con 9,9 mL de MOPS-BLEB para todos los alimentos.

7.2.2 Preparar tubos de MOPS-BLEB según ANEXO 1, letra e).

7.2.3 Incubar por 18 a 24 horas a 35ºC ± 1ºC todos los alimentos.

7.3 **LISIS**

7.3.1 Encender las placas calefactoras y regularlas a 55 y 95ºC± 1ºC. Colocar las gradillas de enfriamiento en el refrigerador. Sanitizar superficies de trabajo, herramientas de trabajo, micropipetas y repetidor, utilizando papel absorbente humedecido con las soluciones de: primero, hipoclorito al 1%, segundo, alcohol 70% y tercero agua destilada. Determinar el número de muestras que se requiere analizar.

7.3.2 En un tubo estéril preparar el buffer de lisis de acuerdo al número de muestras que se va ha analizar mas un volumen para blanco, considerar que se requiere agregar 200 µL de la mezcla de lisis, por muestra.

7.3.3 Mantener la proporción recomendada por el fabricante. Ejemplo 12 mL de buffer de lisis más 150 µL de proteasa, 6 mL de buffer de lisis más 75 µL de proteasa o 3 mL de buffer de lisis más 37,5 µL de proteasa.

7.3.4 Mezclar suavemente en forma de 8 para evitar la producción de espuma**.**

7.3.5 Dosificar en volúmenes de 200 µL por tubo. Este puede ser almacenado en refrigeración hasta por 15 días.

7.3.6 Colocar las muestras en una gradilla ordenadas en hileras de 8.

7.3.7 Colocar los tubos de lisis conteniendo 200 µL de buffer de lisis en el mismo orden que las muestras.

7.3.8 Rotular el primer tubo de cada hilera para evitar confundir la posición.

7.3.9 Si los tubos fueron almacenados a 4 ºC, verificar que se encuentran vigentes para el uso.

7.3.10 Retirar las tapas con la herramienta azul, desplazar la herramienta sobre las tapas haciendo presión sobre ellas y palanquear de derecha a izquierda y viceversa.

7.3.11 Vortear el cultivo y agregar 5 µL de cultivo a cada tubo de lisis.

7.3.12 Colocar las tapas a los tubos de lisis, utilizando la herramienta azul, presionar la palanca metálica para retirar la herramienta sin retirar las tapas y luego presionar con el lomo de la herramienta.

7.3.13 Llevar los tubos a la placa calefactora regulada a 55ºC, durante 60 minutos para realizar la lisis.

7.3.14 Transcurridos los 60minutos, trasladar los tubos a la placa calefactora regulada a 95ºC, durante 10 minutos.

7.3.15 Transcurridos los 10 minutos, trasladar los tubos a la gradilla de enfriamiento por 5 minutos. En esta etapa se puede detener el sistema y dejar en refrigeración hasta por 3 días o congelado a -20 ºC hasta por 20 días.

7.3.16 Dejar todo limpio y sanitizado utilizando las soluciones de hipoclorito de sodio al 1%, etanol 70% y agua destilada.

7.4 PCR

7.4.1 Una vez terminada la lisis encender el termociclador para precalentar. Una vez que al costado izquierdo del equipo se observa destacado con luz la palabra **POWER** hacer un clic sobre el icono termómetro. Abrir la bandeja presionando en la hendidura ubicada al costado derecho y verificar que no hay muestras en el rack.

7.4.2 Hacer clic sobre **next,** aparecerá la siguiente lectura:

Preparing for Rack load
Preparando para cargar el Rack
Please carefully follow instructions.
Por favor siga las instrucciones cuidadosamente
Preparing the cycler for loading.
Preparando para cargar
Do not load cycler yet.
No cargue aún.

7.4.3 Mientras espera que el equipo este listo para cargar, colocar los tubos de reacción, en un rack de enfriamiento que contenga la plantilla metálica de color negro del termociclador.

7.4.4 Marcar el primer tubo de cada hilera de los tubos de reacción para no confundir la posición.

7.4.5 Con ayuda de la herramienta azul retirar las tapas de los tubos de lisis que se encuentran en el rack de enfriamiento.

7.4.6 Con ayuda de la herramienta gris, retirar cuidadosamente las tapas de los tubos de reacción y eliminarlas (movimientos bruscos pueden ocasionar la perdida de la tableta de PCR). Tomar la herramienta gris colocando el dedo pulgar hacia la parte más corta, deslizar la herramienta sobre las tapas y hacer palanca hacia la derecha. Eliminar las tapas.

7.4.7 Con pipeta multicanal introducir las puntas en los tubos de lisis que contienen en el lisado, homogenizar y medir 50 µl.

7.4.8 Agregar el lisado sobre cada tubo de reacción en la posición correspondiente sin tocar la pastilla de reacción.

7.4.9 Colocar las tapas ópticas con la ayuda de la herramienta gris.

7.4.10 Llevar las muestras hasta el equipo. Cuando en pantalla aparece la siguiente lectura:

> ***Cycler has reached load temperatures***
>
> *El equipo ha alcanzado la temperatura de carga.*
>
> *Hacer clic sobre* ***"Next"*** *y parece la siguiente lectura:*
>
> ***Ready for Rack load***
>
> *Listo para cargar.*
>
> ***Please carefully follow instructions.***
>
> *Por favor siga las instrucciones cuidadosamente.*
>
> ***Open the sample drawer and insert your samples. When the samples are in place, close the drawer and press "Next".***
>
> *Abra la bandeja e inserte sus muestras. Cuando las muestras estén en el lugar cierre la bandeja y presione "Siguiente"*

7.4.11 Abrir la bandeja del termociclador presionando en la hendidura ubicada en frente a mano derecha del equipo.

7.4.12 Introducir las muestras al termociclador con la plantilla metálica y ubicar en la posición correcta, es decir, la misma ingresada en el PC.

7.4.13 Cerrar la bandeja del termociclador, presionando desde el frente y hacer clic en **next**, para iniciar la reacción, esta tendrá una duración de 2 a 3 horas, aproximadamente.

7.4.14 Una vez terminado el proceso hacer clic sobre **finish** para terminar.

7.4.15 Imprimir la hoja de resultados y guardar en archivador rotulado "Registro de Lectura e Informe de Resultados Laboratorio de Enterobacterias (Nº 348)", ubicado en el laboratorio 348.

7.4.16 Retirar los tubos de reacción del termociclador y eliminarlos en solución de hipoclorito al 1%.

7.4.17 Apagar los equipos.

7.5 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

7.5.1 En la plantilla de resultados se observa con signo menos (-) las muestras que resultan negativas para *Listeria* y con un signo más (+) las que resultan positivas para *Listeria.*

Un signo de interrogación indica que el resultado es indeterminado y este ocurre cuando el control positivo interno no alcanza el nivel necesario para ser considerado válido y la cantidad de target específico no alcanza a ser detectada. Un resultado indeterminado puede ser debido a los reactivos, fallas en el sistema o error de operación.

7.5.2 El sistema cuenta con un control positivo interno (INPC) por lo cual no requiere incorporar controles positivos o negativos adicionales, solo se incluye un blanco.

7.5.3 En los métodos moleculares el control positivo es un control interno de reacción el cual incluye un target especial y en el caso particular de BAX que es un sistema cerrado y patentado el control interno viene incluido en la pastilla de reacción liofilizada por lo tanto no se necesita un segundo control solo el blanco para evidenciar que los reactivos no han sido contaminados en la manipulación. El sistema está validado de esta forma.

7.5.4 Los resultados se registran en RG-712.00-077, como presuntivo positivo, negativo o indeterminado a la espera de los análisis de confirmativos.

7.6 CONFIRMACIÓN DE CULTIVOS

7.6.1 Todos los resultados positivos por este análisis deben ser confirmados aislando el patógeno desde la muestra presuntiva positiva según procedimiento de Detección y Enumeración de *Listeria monocytogenes* en Alimentos, publicado en BAM online capitulo 10, enero 2003, letra C4, D y E (Anexo Nº2) y confirmadas de acuerdo al procedimiento para identificación bioquímica de cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas en alimentos y ambiente PRT-712.03-086 aplicable a colonia aislada.

7.6.2 La especificidad descrita para el sistema BAX es 0.5% de Falsos Positivos y 0% Falsos negativos.

7.7 INTERPRETACION DE LA CURVA DE MELTING

7.7.1 La curva de meeting muestra dos tipos de Peak; Peak objetivo (*L. monocytogenes*) y Peak de control (INPC). A veces el peak de control de L monocytogenes aparece como un doble peak.

Peak objetivo:

Las reacciones positivas muestran un peak dentro de un rango específico de temperatura, que va de 83,5 a 86 ºC. Los peak pueden moverse dentro de este rango, en caso de reacciones positivas fuertes los peak pueden moverse ligeramente hacia temperatura mas bajas y en reacciones positivas más débiles pueden moverse hacia temperaturas más altas.

Peak de control

El peak de control se produce entre 78 a 80ºC, este puede variar en altura dependiendo de la presencia o ausencia del microorganismo objetivo (*L. monocytogenes*). Frente a altos niveles del microorganismo objetivo, el peak de control puede ser muy pequeño o estar ausente. En ausencia de *L. monocytogenes* solo se observa el peak de control.

7.8 MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD

7.8.1 Se deben seguir las precauciones para organismos nivel de bioseguridad 2

7.8.2 El personal que manipule este debe leer y seguir las instrucciones de seguridad entregadas por los fabricantes de medios de cultivos, reactivos y microorganismos usados en el análisis.

7.8.3 A mujeres embarazadas y personas potencialmente inmunocomprometidas se les debe prohibir el acceso a las áreas donde se realicen procesos de aislamiento o identificación de *L. monocytogenes*

8. REGISTROS

8.1 Registro Resultados análisis *Listeria monocytogenes*

9. ANEXOS

9.1 Anexo N° 1 Preparación de medios de cultivo y suplementos.

9.2 Anexo Nº 2 Detección y Enumeración de *Listeria monocytogenes* en Alimentos. BAM online capitulo 10, enero 2003, letra C4, D y E.

9.3 Anexo Nº 3 Preparación del PC.

9.4 Anexo Nº 4 Preparación del repetidor de volumen.

ANEXO Nº1
PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y SUPLEMENTOS.

a) CALDO DEMI FRAZER

Caldo Demi Frazer comercial	55 g
Agua desionizada	1000 mL

- Mezclar el caldo con el agua destilada
- Ajustar a pH=7,2 +/- 0,2.
- Dispensar en volúmenes de 225 mL.
- Esterilizar a 121ºC por 15 minutos.

b) CALDO ENRIQUECIMIENTO *Listeria* AOAC

Caldo soya triptona	30 g
Extracto de levadura	6 g
Fosfato monopotásico	1,35 g
Fosfato disódico anhidrido	9,6 g
Água destilada	1000 mL

- Disolver y dispensar en volúmenes de 225 mL
- Esterilizar a 121ºC por 15 minutos.
- Agregar 2,5 mL de piruvato de sodio al 10% (p/v), esterilizado por filtración.

c) CALDO DE ENRIQUECIMIENTO SELECTIVO COMPLETO *Listeria* AOAC

Caldo soya triptona	30 g
Extracto de levadura	6 g
Agua destilada	1000 mL

- Ajustar a pH 7,3.
- Dispensar en volúmenes de 225 mL.
- Esterilizar a 121ºC por 15 minutos.
- A cada porción de 225 mL agregar:
  i. 0,45 mL de acriflavina al 0,5% p/v.
  ii. 1,8 mL de ácido nalidixico al 0,5% p/v.
  iii. 1,15 mL de ciclohexamida al 1% p/v en solución de etanol/agua 40% p/v.

Acriflavina 0,5% (p/v)
Pesar 0,1 g de acriflavina.
Resuspender en 20 mL de agua destilada.
Esterilizar por filtración.

Ácido nalidixico al 0,5% (p/v)
Pesar 0,1 g de ácido nalidixico.
Resuspender en 20 mL de agua destilada.
Esterilizar por filtración.

Cicloheximida 1% (p/v)
Mezclar 8 mL de etanol con 12 mL de agua destilada estéril.
Agregar 0,2 g de cicloheximida.
Resuspender en 20 mL de agua destilada.
Esterilizar por filtración.

d) **CALDO UVM**

Proteosa peptona	5 g
Triptona	5 g
Lab Lenco Power (Oxoid)	5 g
Extracto de levadura	5 g
Cloruro de sodio	20 g
Fosfato de potasio	1,35 g
Fosfato de sodio	12 g
Esculina	1 g
Ácido nalidixico (2% en NaOH 0,1 M)	1 mL
Acriflavina-HCl	12 mg
Água destilada	1000 mL.

- Disolver y dispensar en volúmenes de 225 mL.
- Esterilizar a 121ºC por 15 minutos.

d) CALDO DE PREENRIQUECIMIENTO UNIVERSAL

Triptona	5 g
Proteosa peptona	5 g
Fosfato de potasio	15 g
Fosfato de sodio	7 g
Cloruro de sodio	5 g
Dextrosa	0,5 g
Sulfato de magnésio	0,25 g
Citrato de amonio férrico	0,1 g
Piruvato de sodio	0,2 g
Água destilada	1000 mL

a. Calentar con agitación suave para disolver
b. Dispensar en volúmenes de 225 mL.
c. Esterilizar a 121ºC por 15 minutos.
d. El pH final debe ser 6,3 +/- 0,2.

e) MOPS-BLEB

Caldo soya Tripticase	30 g
MOPS libre de ácido	6,7 g
MOPS sal sódica	10,5 g
Extracto de levadura	6 g
Agua destilada	1000 mL.

- Autoclavar a 121 ºC por 15 minutos.
- Agregar por litro de medio:
  - 3,0 mL de acriflavina al 0,5% p/v.
  - 8,0 mL de ácido nalidixico al 0,5% p/v.
  - 5,0 mL de ciclohexamida al 1% p/v en solución de etanol/agua 40% p/v.

Anexo Nº2

Detección y Enumeración de *Listeria monocytogenes* en Alimentos. BAM online capitulo 10, enero 2003, letra C4, D y E.

A) Procedimiento de enriquecimiento:

Pesar una porción de 25 g e incubar a 30ºC por 4 horas en caldo de enriquecimiento Listeria (BLEB). Luego de 4 horas agregar los agentes selectivos, acriflavina 10 mg/L, ácido nalidixico 40 mg/L y ciclohexamida 50 mg/L, esta última puede ser reemplazada por piramicina (natamicina) 25 mg/L. Para matrices con baja carga de hongos y levaduras como, leche y crema pasteurizada, yogurt y mariscos precocidos congelados, se puede omitir la adición de ciclohexamida o piramicina, lo que no se recomienda para el caso de quesos madurados, mariscos ahumados o deshidratados o productos frescos.

B) Procedimiento de Aislamiento:

Luego de completar 24 y 48 horas de incubación en BLEB traspasar una asada de cultivo sobre agares selectivos como Oxford, Palcam, MOX o LPM fortificado con esculina y Fe^{+3}.

Para diferenciar entre especies de *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* es recomendable utilizar uno de los siguientes agares, BCM, ALOA, *RapidL'mono* o CHOMagar *Listeria,* en estos últimos se recomienda el traspaso a las 48 horas. Incubar de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

Oxford, Palcam, MOX, deben ser incubados a 35ºC ± por 24 a 28 horas, LPM debe ser incubado a 30ºC± por 24 a 28 horas.

C) Procedimiento de Identificación

Luego de la incubación en agares selectivos traspasar 5 colonias típicas sobre agar TSA con extracto de levadura e incubar por 24 a 48 horas a 30ºC ± 1ºC.

ANEXO Nº3

PREPARACIÓN DEL COMPUTADOR

- Encender el computador anexo al equipo y hacer clic sobre el icono Launch Bax System.
- Ingresar la clave (.) de uso del personal autorizado para el uso del equipo.
- Crear un archivo para el análisis que se va realizar. Hacer clic en el icono File y luego Save as, en la barra File name ingresar el nombre que se dará al archivo y presionar save.
- Seleccionar con le mouse las celdas que serán utilizadas e ingresar información solicitada por el sistema, en **Target** la opción *Listeria monocytogenes*, en Kit Lot Number, ingresar el número del kit que se utilizará, en **descripción** ingresar información como por ejemplo el tipo de muestra, luego hacer clic sobre **Apply.**
- Hacer clic en el pocillo y luego clic en sample Id, ingresar el número de muestra presionar enter y así sucesivamente para ingresar el número de cada una de las muestras a analizar. Incluir una muestra blanco.
- Luego en **Sample ID**, ingresar pocillo por pocillo el número interno asociado a la muestra se va a procesar en esa posición. Se debe hacer clic sobre la barra **Enter** para que se almacene la información.

ANEXO Nº4
PREPARACIÓN DEL REPETIDOR DE VOLUMEN

- Utilizar punta tipo jeringa de 500 µL. Observar la tabla que viene inscrita en el repetidor.
- De acuerdo al volumen requerido, en este caso 200 µL, seleccionar el canal (2).
- Subir la palanca para bajar el émbolo. En condiciones asépticas abrir la punta tipo jeringa**.** Introducir el tope del embolo en el diente, debe quedar bien ajustado, sino el émbolo no se desplazará.
- Introducir la jeringa en la solución de lisis. Bajar suavemente la palanca para subir el émbolo y aspirar la solución sin producir espuma.
- Descartar las dos primeras descargas en la solución de lisis y luego dosificar en los tubos de lisis que sean necesarios.
- Colocar asépticamente las tapas con la ayuda de la herramienta azul, presionar las tapas y presionar la palanca metálica con el dedo pulgar para retirar la herramienta sin retirar las tapas.
- Verificar el llenado, si hay tubos con menor volumen estos deben ser descartados.